

Pengenalan Teknik-teknik di dalam Bioteknologi

*Mohamad Roji Sarmidi
Kejuruteraan Bioproses*

Pengenalan

Bioteknologi ialah satu bidang yang menumpukan kepada proses-proses transformasi bahan mentah kepada hasil dengan menggunakan agen-agen biologi. Bioteknologi telah melalui berbagai tahap perkembangan. Perkembangan awal bioteknologi bermula dengan munculnya proses-proses tradisi dalam penghasilan bahan-bahan makanan, pengeluaran antibiotik semasa peperangan dunia kedua, pengeluaran asid amino dan enzim untuk kegunaan industri di tahun tujuh puluhan dan seterusnya kepada era bioteknologi moden yang bermula pada pertengahan tahun tujuh puluhan. Dalam proses tradisi agen transformasinya ialah mikroorganisma. Mikroorganisma tersebut dipilih dan disaring secara empirik dari sumber-sumber asli. Manakala di dalam bioteknologi moden agen transformasinya merangkumi mikroorganisma yang telah diubahsuai menggunakan kaedah rekombinan DNA, tisu kultur sel mamalia dan tisu kultur sel tumbuh-tumbuhan. Proses transformasi tersebut pula dilakukan menggunakan kaedah-kaedah kejuruteraan proses moden.

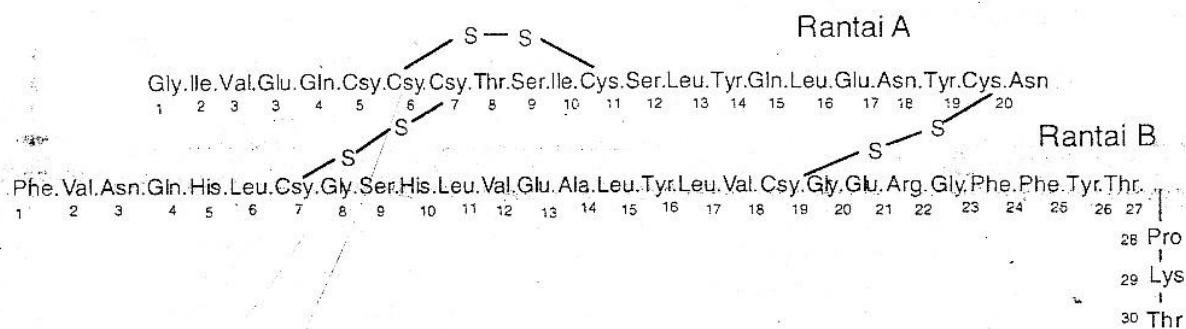
Cabaran pada masa ini dan masa hadapan ialah bagaimana untuk memanfaatkan penemuan dan perkembangan dalam bioteknologi moden ini untuk tujuan pengembangan hasil dan juga pembangunan proses yang lebih cekap dan berkesan. Tulisan ini cuba membincangkan bagaimana kaedah-kaedah di dalam bioteknologi moden ini yang melibatkan rekombinan DNA dan juga proses-proses hiliran digunakan untuk menghasilkan bahan terapeutik iaitu insulin. Insulin ialah sejenis hormon yang digunakan untuk merawat penyakit diabetes melitus ataupun kencing manis. Di dalam tubuh kita insulin dikeluarkan oleh sel- β di dalam islets of Langerhans yang terdapat di pankreas. Serangan penyakit terhadap bahagian ini atau sebab oleh komplikasi lain yang menyebabkan insulin tidak dapat dikeluarkan mengakibatkan berlakunya penyakit diabetes melitus.

Diabetes melitus dan insulin

Penyakit Diabetes melitus memberi kesan secara langsung kepada metabolisme karbohidrat, lemak dan protein. Ini adalah disebabkan oleh kekurangan insulin secara mutlak (jenis I) ataupun secara relatif (jenis II) untuk mengawal penggunaan glukosa di dalam tubuh badan. Di dalam tubuh badan, karbohidrat ditukarkan kepada glukosa yang menjadi bahan utama untuk menjana tenaga. Apabila berlaku kekurangan insulin sel-sel tubuh badan tidak dapat menggunakan glukosa. Ini menyebabkan kepekatan glukosa di dalam darah meningkat dan mengakibatkan berlakunya keadaan hyperglisemia. Kekurangan insulin juga mengakibatkan pengawalaturan simpanan glikogen tidak dapat dilakukan. Keadaan ini mengakibatkan glukosa tidak dapat ditukarkan kepada glikogen dan ini menambah lagi kepekatan glukosa dalam darah. Satu lagi kesan akibat ketiadaan insulin ialah menyebabkan sel-sel dalam tubuh badan menggunakan lemak dan protein sebagai sumber tenaga. Keadaan ini membawa beberapa masalah sampingan seperti meningkatnya kandungan urea, asid lemak dan keton di dalam darah. Jika kandungan glukosa dan bahan kimia yang lain tidak dikawal ia akan mengakibatkan berlakunya masalah seperti poliuria, polidipsia dan berbagai komplikasi yang lain.

Sumber tradisi insulin untuk merawat diabetes ialah daripada pankreas bovin (lembu) dan porsin (khinzir). Walaubagaimanapun beberapa masalah timbul untuk bergantung kepada insulin dari sumber-sumber tersebut. Yang pertama, insulin dari sumber bovin dan porsin adalah tidak sama dengan insulin manusia dan juga terdapat bendasing seperti peptida pankreas, somatostatin dan lain-lain lagi. Insulin dari sumber bovin mempunyai perbezaan tiga asid amino jika dibandingkan dengan insulin manusia. Sementara insulin porsin berbeza satu asid amino sahaja. Walaupun perbezaan tersebut hanya sedikit sahaja tetapi ia boleh menimbulkan masalah-masalah imunogen. Keduanya ialah masalah untuk mendapatkan bekalan pankreas yang mencukupi dan sumber tersebut terutamanya daripada porsin memang menimbulkan masalah penerimaan oleh orang Islam.

Masalah tersebut di atas pada masa ini cuba diatasi dengan kaedah proses hiliran dan juga tindakbalas enzim untuk menukarkan insulin dari porsin kepada insulin yang mempunyai kandungan asid amino yang sama dengan insulin manusia. Insulin daripada porsin berbeza dengan insulin manusia pada asid amino yang ke tiga puluh di rantai B. Di dalam insulin daripada porsin asid amino yang ke tiga puluh di rantai B ialah alanin, sementara insulin manusia pula ialah threonin.



Rajah 1. Urutan asid amino di dalam insulin manusia

Kaedah yang kedua ialah dengan menggunakan kaedah rekombinan DNA di mana gen mikroorganisma diubahsuai untuk menjadikannya sebagai pengeluar insulin. Syarikat Eli Lilly (USA) menggunakan *Escherichia coli* sebagai mikroorganisma perumah sementara syarikat Novo-Nordisk (Denmark) pula menggunakan yis sebagai sel perumah. Tulisan ini akan membincangkan pengeluaran insulin menggunakan kaedah yang dimajukan oleh syarikat Eli Lilly dengan menggunakan teknik yang dilesenkan oleh syarikat Genentech.

Rekombinan DNA: Sepintas lalu

Asid deoksiribonukleik atau lebih dikenali sebagai DNA ialah makromolikul yang mengandungi gen yang mengkod jujukan asid amino untuk membentuk rantai peptida iaitu struktur asas kepada segala jenis protein. Secara umumnya proses pengungkapan gen kepada jujukan asid amino di dalam sel melalui dua langkah utama. Pertama ialah proses transkripsi dimana mRNA (messenger Ribonucleic acid) terbentuk dengan menggunakan maklumat dalam gen sebagai templat. Langkah kedua ialah proses translasi ialah pembentukan rantai peptida dengan jujukan yang dikodkan oleh mRNA. Dengan memahami bagaimana proses sintesis insulin tersebut berlaku di dalam sel, proses yang sama boleh dilakukan di dalam mikroorganisma perumah.

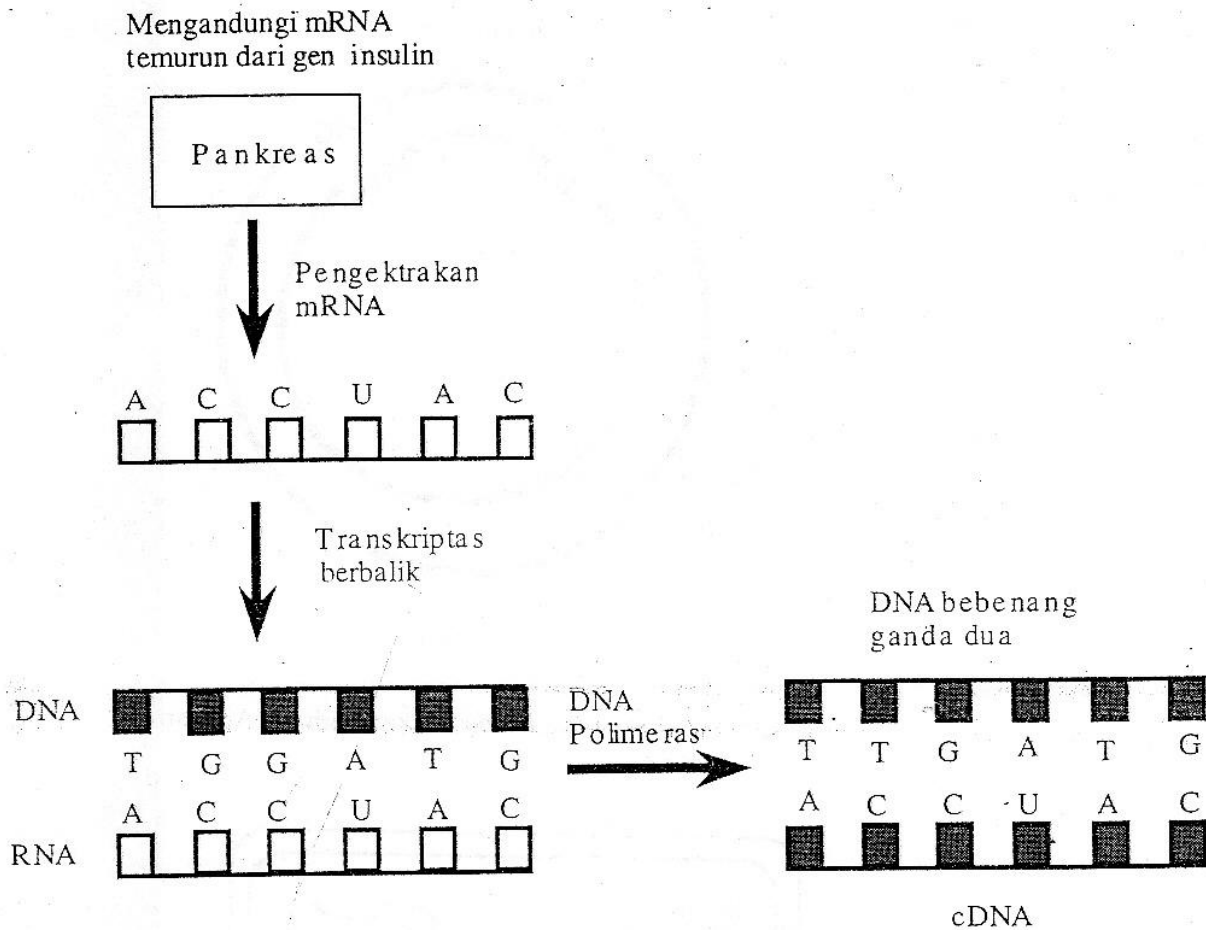
Untuk menjadikan mikroorganisma menjadi pengeluar insulin, gen yang mengkodkan insulin perlu ada di dalam sel. Dari segi prinsipnya kaedah rekombinan DNA adalah mudah, tetapi secara praktik ianya merupakan proses yang memerlukan keupayaan teknologi yang tinggi untuk berupaya melakukan transformasi bahan mentah kepada hasil insulin. Oleh kerana keperluan kepada insulin adalah meningkat setiap tahun, dorongan untuk menghasilkan bahan tersebut adalah tinggi.

Proses pengeluaran insulin menggunakan kaedah rekombinan DNA ini melalui beberapa tahap. Ia bermula dengan konsep asas yang menilai tentang keperluan terhadap pembaharuan dalam pengeluaran insulin hinggalah kepada pengujian klinik. Dari aspek teknologi, empat komponen utama untuk melakukan proses transformasi perlu digabungkan. Komponen tersebut meliputi kepakaran, peralatan, maklumat dan organisasi. Pada masa yang sama keempat-empat komponen tersebut perlu berada di tahap yang tertinggi. Gabungan komponen teknologi tersebut harus mampu untuk melakukan fungsi-fungsi seperti pengembangan hasil dan proses, kajian klinik, formulasi hasil, pengeluaran dan pemasaran. Disamping itu proses formulasi dan pengeluaran harus memenuhi syarat-syarat yang dikehendaki oleh pihak pengawalatur seperti CPMP (Commitee for Proprietary Medicinal Product) di kesatuan Eropah, FDA (Food and Drug Administration) di Amerika syarikat dan PAB Pharmaceutical Affairs Bureau) di Jepun. Diantara syarat dan peraturan pengeluaran yang harus dipenuhi ialah GLP (Good Laboratory Practice), GMP (Good Manufacturing practice), QC (Quality control), dan QA (Quality Assurance) yang dipraktik di peringkat antara bangsa.

Pengeluaran insulin

Insulin di keluarkan di dalam sel manusia melalui tiga peringkat yang utama iaitu proses translasi mRNA kepada pra pro-insulin dan seterusnya kepada pro-insulin dan akhirnya insulin. Pra pro-insulin mengandungi empat bahagian A, B, C dan komponen urutan isyarat dan pro-insulin pula mengandungi rantai A, B dan C. Untuk melakukan proses tersebut di dalam sel perumah terdapat dua cara yang boleh diikuti. Yang pertama ialah untuk mensintesis rantai A dan B di dalam sel perumah yang berasingan dan mencantumkan keduanya di luar sel. Cara yang kedua ialah dengan mensintesis pro-insulin di dalam sel perumah dan menukarkan kepada insulin secara berenzim di luar sel. Syarikat Eli Lilly memilih cara yang kedua untuk pengeluaran insulinnya. Mikroorganisma perumah yang digunakan ialah *Escherichia coli* jenis K-12 dan vektor yang digunakan ialah plasmid pBR322.

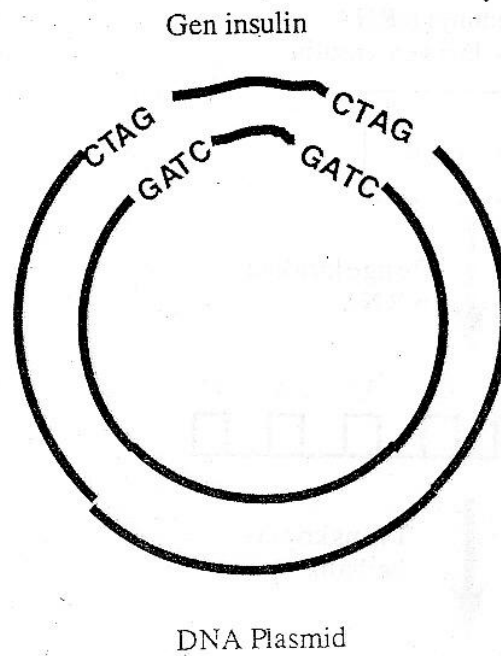
Langkah pertama di dalam proses tersebut ialah pengasingan dan penulisan gen insulin dari sel β di dalam Islets of Langerhan untuk mendapatkan mRNA yang mengkodkan kepada insulin. Daripada mRNA tersebut salinan DNA (cDNA) untuk insulin boleh diperolehi dengan menggunakan kaedah seperti yang di tunjukan oleh Rajah 2.



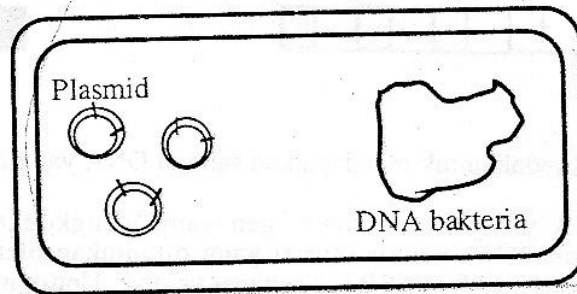
Rajah 2. Kaedah untuk mendapatkan salinan DNA yang mengandungi gen insulin

Setelah itu, cDNA yang mengandungi gen yang mengkodkan kepada insulin perlu disisipkan ke dalam DNA vektor seperti yang ditunjukkan oleh Rajah 3. Di Eli Lilly mereka menggunakan plasmid pBR322 sebagai vektor. Untuk melakukan proses tersebut DNA vektor tersebut dipotong dengan menggunakan enzim pembatas. Di penghujung rantai DNA yang mengandungi gen insulin disambung pula dengan jujukan perangkai CTAG untuk membolehkan ianya disambung kepada DNA plasmid. Proses penyambungan tersebut dilakukan menggunakan enzim DNA ligase. Disamping jujukan perangkai, insulin gen perlu kepada jujukan promotor untuk membolehkan proses pengungkapan insulin beroperasi dengan cekap. Promotor yang digunakan oleh mereka ialah tryptophan synthetase. Promotor ini adalah lebih berkesan jika dibandingkan dengan β -galactosidase (β -gal).

Plasmid yang mengandungi gen insulin manusia kemudian dimasukkan ke dalam sel perumah bakteria *Escherichia coli* (Rajah 4). Di dalam sel perumah plasmid tersebut boleh mengganda untuk menghasilkan replikat yang banyak. Di dalam media yang sesuai bakteria *Escherichia coli* pula berupaya mengganda setiap lebih kurang 20 minit. Oleh itu dalam masa yang singkat berjuta-juta sel yang mengandungi gen insulin manusia boleh diperolehi untuk tujuan pengeluaran insulin.



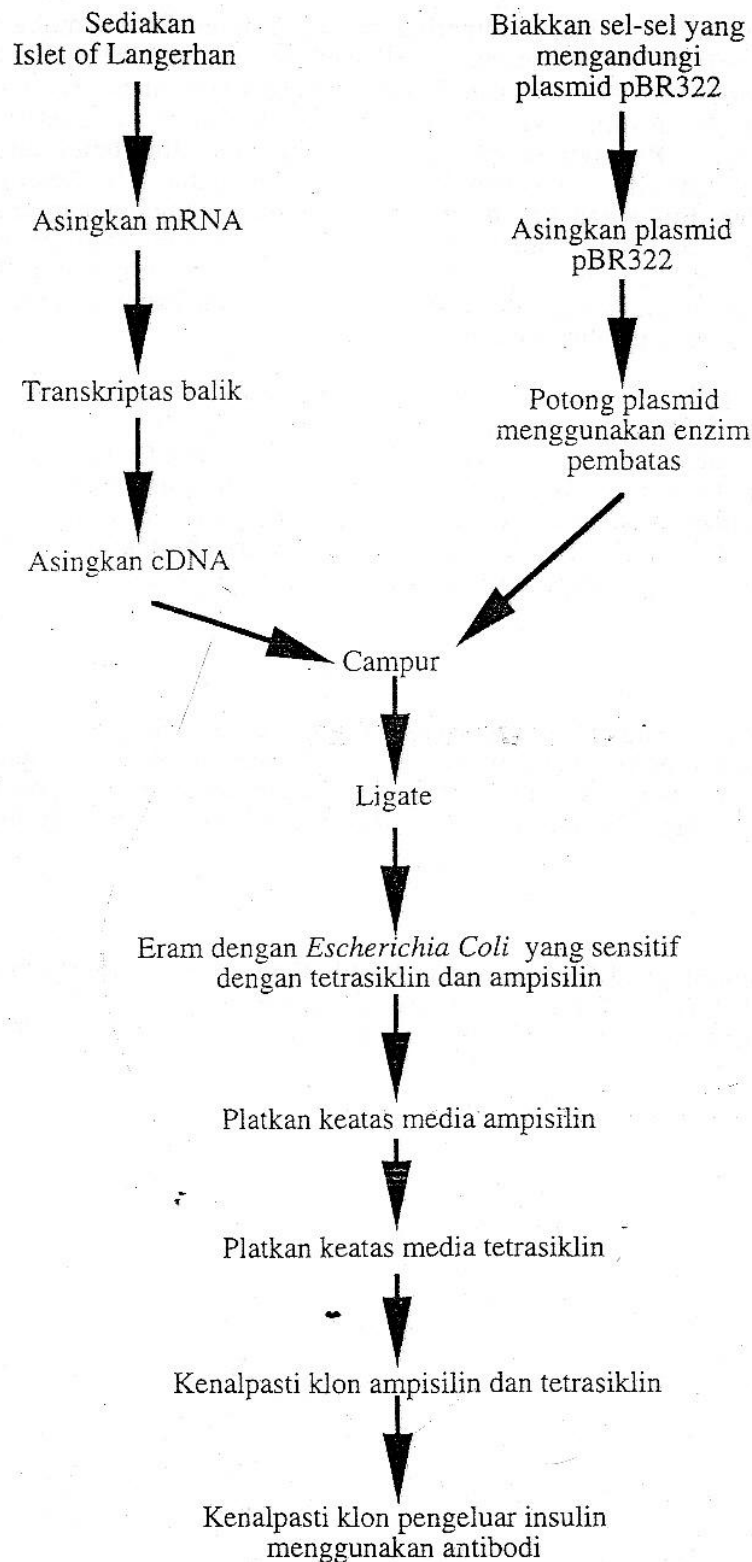
Rajah 3. penyisipan gen insulin kedalam DNA plasmid



Bakteria *Escherichia coli*

Rajah 4. Plasmid mengandungi gen insulin di dalam *Escherichia coli*

Prosedur keseluruhan untuk menjadikan sel perumah sebagai pengeluar insulin adalah ditunjukkan di dalam Rajah 5.



Rajah 5: Proses transformasi keseluruhan untuk mendapatkan sel pengeluar insulin

Proses seterusnya ialah pembiakkan klon terpilih di dalam fermentor untuk menghasilkan pro-insulin. Insulin yang terhasil dari proses fermentasi ialah dalam bentuk protein kimerik tryp-E met pro-insulin yang merupakan hasil intrasel. Oleh itu langkah pertama untuk menuliskan insulin ialah pemisahan pepejal/cecair untuk mendapatkan sel. Ini diikuti dengan proses penghomogenan untuk mengeluarkan hasil dari dalam sel.

Pemprosesan hiliran ini akan diperincikan dibahagian kedua makalah ini. Secara umumnya setelah protein kimerik try-p-E met pro-insulin diperolehi, ikatan di dalam protein kimerik tersebut diuraikan dengan menggunakan sianobromida (CNBr) untuk mendapatkan pro-insulin. Walaubagaimanapun pro-insulin yang terurai telah berubah konfigurasi. Konfigurasi pro-insulin seterusnya diperbetulkan dengan proses pengoksidaan sulfitolisis, pelipatan dan pembentukan ikatan S-S. Seterusnya pro-insulin ditulinkan dan ditukarkan kepada insulin yang aktif menggunakan enzim trypsin dan karboksiptidasa. Insulin yang aktif ditulinkan menggunakan penurasan gel, kromatografi pertukaran ion dan akhirnya dikristalkan. Kawalan kualiti untuk insulin dari aspek fisikal, kimia, biologi dan imunologi dilakukan untuk memastikan bahawa insulin yang diperolehi adalah sama dengan insulin manusia.

Syarikat Eli Lilly dan Genentech mengambil masa empat tahun untuk melaksanakan projek tersebut. Masa tersebut adalah pendek jika dibandingkan dengan projek-projek menghasilkan bahan-bahan ubatan yang lain. Ini ialah kerana Eli Lilly memang merupakan pengeluar tradisi insulin dari sumber porsin. Oleh itu komponen-komponen teknologi untuk melakukan transformasi seperti informasi, kepakaran, infrastuktur dan pasaran telah mereka miliki. Ini merupakan contoh bagaimana bioteknologi digunakan untuk mendapatkan hasil dengan menggunakan kaedah pengeluaran yang lebih baik.

Kesimpulan

Insulin manusia yang dihasilkan menggunakan kaedah rekombinan DNA memastikan sumber insulin yang selamat dan bekalan yang berterusan. Untuk menguasai teknologi ini kesemua komponen teknologi untuk melakukan transformasi perlu dikuasai. Ini melibatkan gabungan kepakaran dari berbagai bidang pada tahap yang tinggi.

Rujukan

- 1 Biotechnological Innovations in health Care. Biotechnology by Open Learning Edited by G. Turnock. Butterworth-Heinemann 1991.
- 2 Comprehensive Biotechnology. Edited by Murray Moo Young, Pergamon Press, New York 1991.